

# GPIb 結合ドメインならびにC末端部分を 認識する抗 von Willebrand 因子(vWF) モノクローナル抗体を用いた vWF 抗原量の測定

奈良県立医科大学小児科学教室

宮 田 茂 樹

## IMMUNOASSAY FOR VON WILLEBRAND FACTOR (VWF) USING ANTI-VWF MONOCLONAL ANTIBODIES WHICH RECOGNIZE DISCRETE EPITOPES, GPIB BINDING DOMAIN AND C-TERMINAL PORTION OF THE VWF SUBUNIT

SHIGEKI MIYATA

*Department of Pediatrics, Nara Medical University*

Received September 30, 1991

*Summary* : Sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for von Willebrand factor antigen (vWF : Ag) were developed using three anti-vWF monoclonal antibodies (MoAbs), NMC-4, 2-2-9, and 40-1. In these ELISA, polyclonal rabbit anti-vWF antibody (IgG) was used as a captured antibody and the peroxidase-labeled MoAbs as the second antibody. MoAb NMC-4 recognizes platelet glycoprotein (GP) Ib binding domain (residue 449-728 of vWF subunit), whereas the epitope of MoAb 2-2-9 locates on the residue 1926-(2050), and that of MoAb 40-1 on the disulfied-linked two polypeptides of the residue 1781- and 1926-(2050). The results obtained by NMC-4, 2-2-9, or 40-1 : ELISA showed a good correlation with those by the double polyclonal ELISA in 30 normal plasmas.

In 7 patients with type I von Willebrand disease (vWD), vWF : Ags measured by NMC-4, 2-2-9, and 40-1 : ELISA were  $22.0 \pm 16.0$ u/dl,  $21.9 \pm 17.2$ u/dl, and  $24.3 \pm 19.2$ u/dl respectively. In 7 patients with type IIA vWD, the respective values were  $40.9 \pm 16.4$ u/dl,  $24.0 \pm 8.4$ u/dl, and  $40.1 \pm 16.8$ u/dl. Thus, the significant lower value in type IIA patients was noticed when it was assayed only by 2-2-9 : ELISA. In 3 patients with type IIB vWD, those values were  $53.3 \pm 8.6$ u/dl,  $51.0 \pm 8.0$ u/dl, and  $53.0 \pm 8.3$ u/dl respectively, and no discrepant value was obtained.

In 30 normal plasmas, the values of vWF : Ag measured by NMC-4 : ELISA were well correlated with both the activities of ristocetin cofactor (Rcof) and botrocetin cofactor (Bcof). In 7 patients with type I vWD, the correlation coefficient between the vWF : Ag values by NMC-4 and Rcof or Bcof was  $r=0.7635$  or  $r=0.5929$  respectively. In 7 patients with type IIA vWD, Rcof in all these patients was too low to determine the correlation coefficient, but that value between vWF : Ag levels by NMC-4 ELISA and Bcof was  $r=0.5831$ . In 3 patients with type IIB vWD in the same family, the coefficient was  $r=0.9899$  or  $r=0.9997$  respectively. Thus, the values of vWF : Ag by NMC-4 ELISA appear to reflect

Bcof activity rather than Rcof activity.

## Index Terms

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), von Willebrand disease (vWD), monoclonal antibody, GPIb binding domain, C-terminal portion

## 結 言

von Willebrand 因子(vWF)はヒト染色体No.12 上の vWF 遺伝子の支配を受け血管内皮細胞及び骨髄巨核球にて合成される巨大糖蛋白質である。血漿 vWF は SDS アガロースゲル電気泳動法の解析で分子量  $0.5 \times 10^3 \sim 10 - 20 \times 10^3$  kDa におよぶ連続した multimer 構造を形成し、個々の multimer は 2050 のアミノ酸配列を有する subunit から成り立っていることが知られている<sup>1)2)3)4)</sup>。vWF subunit の機能 domain についての解析が進められ、Ser 1~Arg 272 は第VIII因子結合 domain<sup>5)6)</sup>、Val 449~Lys 728 が血小板糖蛋白(GP)Ib 結合 domain 及び heparin 結合 domain<sup>7~11)</sup>、Gly 911~Glu 1365 は collagen 結合 domain<sup>12)13)</sup>、1744~1747 の Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS)は GP II b/III a 結合 domain<sup>4)14)</sup>であることが明らかになった。

vWF 蛋白の測定は Zimmerman et al.(1971)<sup>15)</sup>によりヒト血漿第VIII因子/vWF 分画を家兎に免疫して得られた抗血清(ポリクロナール抗体, poly Ab)を用いた Laurell 法による免疫学的方法が臨床的に有用であるとして広く用いられてきた。1970 年代後半には poly Ab を用いた固相免疫放射能測定法(solid phase immunoradiometric assay, IRMA)あるいは、酵素標識抗体を用いた enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)など、Laurell 法より感度の高い微量測定法が開発された<sup>16)</sup>。更に 1980 年代にはモノクロナール抗体(MoAb)作成技術が凝血学的分野にも導入され、vWF に対する種々の MoAb が作成され、vWF:Ag の測定のみならず vWF の各機能 domain の分離、分析にも導入されるようになった<sup>17)18)19)</sup>。

教室では嶋ら(1985)<sup>20)</sup>が vWF に対する 5 種類の MoAb を作成したが、このうち NMC-4 は ristocetin 存在下のヒト多血小板血漿の血小板凝集を抑制する抗体であった。新家、藤村らは NMC-4 は ristocetin 及び蛇毒 botrocetin により誘導される vWF と血小板膜 GPIb との結合反応を抑制する抗体であり NMC-4 の epitope は vWF subunit の GPIb 結合 domain(アミノ酸残基 449-728)上にあることを明らかにした<sup>11)</sup>。また、著者は vWF subunit の C 末端側を認識する 2 種類の MoAb, 2-2-9

(米国 Scripps 研究所)および 40-1(宝酒造)を供与される機会を得た。

著者はヒト血漿中の vWF:Ag の測定にあたり、ELISA 系で、一次抗体として家兎より得た poly Ab を用いて血漿 vWF を捕捉し、二次抗体として反応 domain の明かな MoAb を用いれば domain 内の構造あるいは機能を反映した vWF:Ag 量を測定しうるのではないかと想定した。このようなことから、MoAb NMC-4, 2-2-9 あるいは 40-1 を二次抗体としたそれぞれの ELISA 系による正常及び vWD 各病型患者血漿中の vWF:Ag 量を比較検討した。

さらに、NMC-4 を用いた ELISA 系による vWF:Ag と GPIb 結合 domain の in vitro における生物学的活性を反映する Ristocetin cofactor 活性ならびに Botrocetin cofactor 活性とを正常ならびに vWD 各病型血漿にて比較検討した。

## 試料および方法

1) 対象: von Willebrand 病 Type I 7 例, Type IIA 7 例, Type IIA 7 例, Type IIB 同一家系 3 例について検索した。20~40 歳の健康成人男子 15 名, 女子 15 名を対照とした。

2) 血漿: 21 G 注射針を装着したプラスチック製デイスボザブル注射器を用いて、肘静脈よりすみやかに採取した全血 9 容を 3.8% クエン酸ナトリウム 1 容の入ったプラスチック製試験管に加え、さらに protease inhibitor として終濃度 1mM leupeptin, 5mM N-ethylmaleimide, 5mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 200 KI unit/ml aprotinin を加え混和し、3,000 回転 15 分間遠心し血漿を得た。これらの血漿を少量ずつプラスチックチューブに分注し、用に臨むまで -80℃ で保存した。

3) vWF および Fragment II の純化物: クリオプレチピテートよりの vWF の純化、および vWF の *Staphylococcus aureus* protease V8 分解産物である Fragment II は Girma et al. の方法<sup>21)</sup>により作製した。

4) Botrocetin の純化: 粗製 *Bothrops jararaca* venom (Sigma Co.) からの二本鎖 botrocetin の純化は Fujimura et al. の方法<sup>22)</sup>に準じ、以下の方法にて作製し

た. *Bothrops jararaca* 粗毒を出発材料とし DEAE Sepharose CL-6B にて 0.1 M から 0.7 M 食塩で直線勾配溶出をおこない、血小板凝集活性の認められた分画をブールし、それを HPLC TSK G 3000SW + G 2000SW として HPLC phenyl-superoxe カラムクロマトグラフィーにて精製し、最終的に SynChropak RP-8 逆相クロマトグラフィーにて二本鎖 botrocetin を純化した。

5) ホルマリン固定血小板の作成：健康成人より採取した全血と ACD(acid citrate dextrose)液を 5 対 1 容に混和し、2,300rpm 30 秒間遠心し、上清を血小板多血漿 (platelet rich plasma, PRP) とした。PRP に終濃度 5 単位/ml となるようにアピラーゼ(血小板内 ADP 転換酵素抑制剤)(Sigma Co.)を加えた後、終濃度 10mM となるように EDTA を加え、2,300rpm で 15 分間遠心し、沈渣をタイロッド緩衝液(pH6.5)に再浮遊させた。この洗浄操作を 3 回繰り返した後、同量の 2%ホルマリン加タイロッド緩衝液(pH7.3)を加え、37℃ 1 時間インキュベートした後 4℃ に静置、翌日この混和液を 2,300rpm で 15 分間遠心し、沈渣を 0.02%窒化ソーダ加里ン酸緩衝液(PBS)(pH7.3)で再浮遊させる操作を 3 回行い、ホルマリン固定血小板とした。血小板数  $1 \times 10^6/\mu\text{l}$  となるよう調整した後 4℃ 保存した。

6) Ristocetin cofactor(Rcof)活性の測定：ホルマリン固定血小板を用いた西尾<sup>23)</sup>の方法に準拠した。Ristocetin(Lundberg Co.)の終濃度は 1 mg/ml を用いた。

7) Botrocetin cofactor(Bcof)活性の測定：前述の Rcof 活性の測定と同様の系によった。botrocetin 終濃度は 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を使用した。

8) 抗 vWF マウス MoAb：嶋ら<sup>20)</sup>の作製した GPIb 結合 domain(アミノ酸残基 449-728)を認識し、ristocetin 及び蛇毒 botrocetin による vWF と GPIb との結合反応を阻害する MoAb である NMC-4<sup>11)</sup>を使用した。

また、vWF subunit の C 末端側を認識し、リストセチン及び蛇毒ボトロセチン惹起血小板凝集、collagen binding、血小板 IIb/IIIa への binding および F. VIII binding 等、既知の vWF 機能に全く影響を与えない二種類の MoAb のうち 2-2-9 は Dr. Theodore S. Zimmerman より、40-1 は片山政彦氏(宝酒造株、大津市)より供与を受けた。これらの抗体の epitope の詳細は“成績”にて述べる。IgG1 に属する各 MoAb の精製は Protein A-Sepharose CL-6B カラムを用いて、Ey et al.<sup>24)</sup>の方法に準じて行った。

9) Iodination: MoAb 40-1 を Franker & Speck の方法<sup>25)</sup>に準じ、Iodogen 法にて <sup>125</sup>I 標識を行った。<sup>125</sup>I 標

識した 40-1 の比活性は  $0.64 \times 10^9 \text{cpm}/\text{mg}$  であった。

10) ペルオキシターゼ標識 MoAb 及び polyAb の作製：Nakane & Pierce<sup>26)</sup>の方法に準じてペルオキシターゼ標識抗体を作製した。

11) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)を用いた vWF:Ag の測定：Yoshioka et al.<sup>27)</sup>に準じ、以下の方法にてサンドイッチ ELISA にて測定した。抗 vWF 家兎 poly Ab を固相化一次抗体とし、終濃度 IgG10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように 0.1M 重炭酸緩衝液 (pH9.6)にて希釈しポリスチレン製 microtiter well (Nunc. Denmark)に 200  $\mu\text{l}$  ずつ分注し、4℃ にて一昼夜コーティングした。次に各 well を 200  $\mu\text{l}$  ずつの 0.05% Tween 20 含 0.01 M リン酸緩衝液(PBS/T20)にて 3 回洗浄し、洗浄液を十分取り除いた後、同量の 1% bovine serum albumin(BSA)含 0.1 M 重炭酸緩衝液(pH9.6)を分注し室温一時間にてブロッキングし、PBS/T20 にて 3 回洗浄した。1% BSA 含 PBS/T20 にて段階希釈した正常ブール血漿および患者血漿を各々 100  $\mu\text{l}$  well に加え室温にて 2 時間放置した後、洗浄し、MoAb NMC-4, 2-2-9, 40-1 及び poly Ab をペルオキシターゼ標識二次抗体とし終濃度 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように PBS/T20 にて希釈し各々 100  $\mu\text{l}$  を well に加え室温にて 2 時間放置した後、再び洗浄し、o-phenylene diamine を発色基質として用い vWF:Ag 量を測定した。

12) MoAb 2-2-9 による [<sup>125</sup>I] 40-1 の固相化 vWF への結合阻害：抗 vWF 家兎 poly Ab を固相化一次抗体とし、終濃度 IgG10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように 0.1 M 重炭酸緩衝液(pH9.6)にて希釈しシオノギチューブに 500  $\mu\text{l}$  ずつ分注し、4℃ にて一昼夜コーティングした。次に各チューブを 1 ml ずつの 0.05% Tween 20 含 0.01 M リン酸緩衝液(PBS/T20)にて 3 回洗浄し、洗浄液を十分取り除いた後、同量の 4% bovine serum albumin(BSA)含 0.1 M 重炭酸緩衝液(pH9.6)を分注し室温一時間にてブロッキングし、PBS/T20 にて 3 回洗浄した。4% BSA 含リン酸緩衝液で終濃度 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に希釈した純化 vWF を 300  $\mu\text{l}$  ずつ分注し再び 4℃ にて一昼夜放置した。洗浄用緩衝液各 1 ml で 3 回洗浄し終濃度が各々 100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるように洗浄用緩衝液で希釈した MoAb(40-1, 2-2-9)を、また対照として抗ヒトサイログロブリン MoAb の希釈列ならびに緩衝液のみを各々 300  $\mu\text{l}$  ずつ分注し、さらに <sup>125</sup>I で標識した 40-1 (終濃度 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を加え 4℃ にて一昼夜放置し、洗浄用緩衝液各 1 ml で 3 回洗浄した後ガンマカウンターで測定した。

13) N 末端アミノ酸分析：N 末端アミノ酸分析は

Applied Biosystems 470A Protein Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA)によって行った。

14) Electrophoresis: SDS-polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE), Western blotting 法, オートラジオグラフィーは Fujimura et al.の方法<sup>7)</sup>に準じて行った。

## 成 績

1. vWF に対する MoAb 40-1 および MoAb 2-2-9 の epitope の解析: MoAb 2-2-9 と MoAb 40-1 の vWF subunit 上の epitope はいずれも vWF を staphylococcus protease V-8 (SP-V8) で消化して得られる Fragment II (アミノ酸残基 1366-2050) 上に存在することが明らかにされていた<sup>11)</sup>。両 MoAb の epitope が Fragment II のどの部位にあるかを明らかにする目的で、vWF-Fragment II を subtilisin にて基質酵素比 100/1 にて 37°C 2 時間二次消化し、直列 TSK 3000SW + 2000 SW (Toyo Soda, Tokyo, Japan) を用いたゲル濾過 HPLC にて分離し、2-2-9 および 40-1 といずれにも反応する蛋白 peak を得た。このピークをプールし、濃縮・透析後、凍結乾燥し、さらに SynChropak RP-8 を用いた逆相 HPLC によるアセトニトリル 0 → 60 % グラ

ジェント溶出で 2 つの major peak を得た (Fig. 1)。このうち、最初のピーク (B) を 5 ~ 20 % SDS PAGE 後、Coomassie Blue 染色を行ったところ、非還元にて 97kDa/60 kDa、還元にて 22kDa/15kDa を示す 2 つのフラグメントを認めた (Fig. 1, inset)。このピーク (B) を western blotting 後、オートラジオグラフィーで 2-2-9 及び 40-1 との免疫反応性を検討したところ、2-2-9 は非還元条件で 97kDa および 60kDa の band と、還元条件で 22kDa の band との間で免疫反応性を示した。一方 40-1 は非還元条件で 97kDa および 60kDa の band と免疫反応性を示したが、還元条件下では反応性は認めなかった。このため、非還元条件下に得られた 97, 60kDa の band を還元アルキル化し、Cosmosil 5C8-300 (Nakarai Tesque, Kyoto) を用いた逆相 HPLC によるアセトニトリル 0 → 60 % グラジェント溶出でさらに分離したところ 3 つの major peak を得た。

MoAb 2-2-9 と還元条件下で免疫反応を示した 22kDa の band の N 末端アミノ酸分析をおこなったところ、アミノ酸配列は Arg-Val-Thr-Gly-Cys を示し、2-2-9 の epitope はアミノ酸残基 1926-(2050) 上に存在することを明らかにし得た。一方、40-1 と非還元条件下で

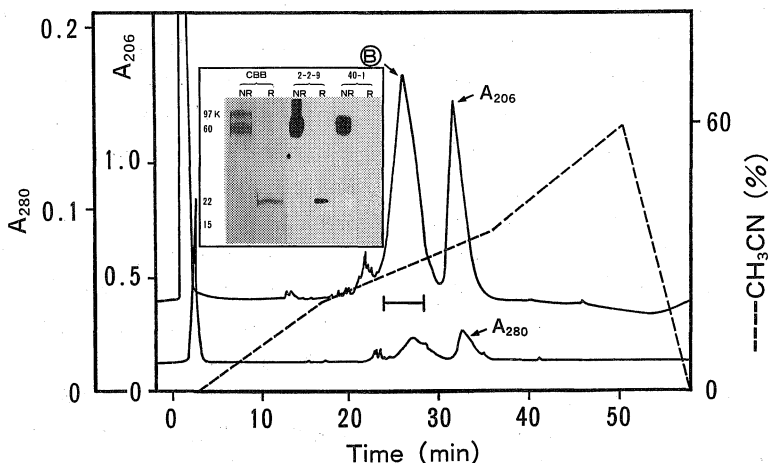


Fig. 1. Separation of subtilisin-digested fragment II on reversed-phase HPLC using SynChropak RP-8 column.

Subtilisin digest of fragment II was first separated by size exclusion HPLC on tandem TSK 3000 SW and 2000 SW columns (not shown), then the fractions reactive with MoAbs 2-2-9 and 40-1 were further purified (marked as "B") by reversed-phase HPLC on a SynChropak RP-8 column using a gradient elution of acetonitrile from 0 to 60%. (Inset) SDS-PAGE (15%) and western blotting analysis of protein peak "B" under non reducing conditions (NR) and reducing conditions (R). Left: coomassie brilliant blue staining (CBB). Middle: western blotting using MoAb 2-2-9. Right: western blotting using MoAb 40-1.

免疫反応性を示した 97,60kDa band を還元アルキル化し逆相 HPLC によって溶出された 3 つの major peak の N 末端アミノ酸分析では、アミノ酸残基 1781 から始まる fragment とアミノ酸残基 1926 から始まる fragment が得られた。従って 40-1 は disulfide 結合にて形成された conformation epitope を認識するとともにその epitope はこれらいずれかのフラグメント上にあることが推定された (Fig. 2)。

2. 固相化 vWF への  $[^{125}\text{I}]$  MoAb 40-1 (IgG) の結合に対する MoAb 2-2-9 の阻害効果

MoAb 2-2-9, 40-1 の交叉反応性を観察するため、ポリスチレン製チューブに抗 vWF poly Ab を固相化し、純化 vWF を反応後、 $^{125}\text{I}$  標識 40-1 MoAb を添加結合せしめた。この際、非標識の MoAb 40-1 あるいは MoAb 2-2-9 を、また対照として抗ヒトサイログロブリン MoAb を同時に添加し、 $^{125}\text{I}$  標識 40-1 の結合に対する抑制効果を検討した。固相化 vWF への  $^{125}\text{I}$  標識 40-1 の結合は終濃度  $10\mu\text{g/ml}$  以上の非標識 MoAb 40-1 添加により完全に抑制されたが、非標識 2-2-9 ではその結合は  $100\mu\text{g/ml}$  で 50% 阻害され部分的に抑制されるのみであった。対照として用いた抗ヒトサイログロブリン MoAb では全く抑制されなかった (Fig. 3)。従って MoAb 40-1 と MoAb 2-2-9 の epitope は近傍にあるものの異なっていると推定された。

3. 家兎 poly Ab を固相化一次抗体として用い、数種抗 vWF 抗体 (MoAb NMC-4, 2-2-9, 40-1 及び poly Ab) を標識二次抗体とした enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) を用いて測定した健康成人ならびに各病型患者血漿における vWF: Ag 量

ポリスチレン製 microtiter well に抗 vWF poly Ab を固相化し、被検血漿と反応後、ベルオキシターゼラベル二次抗体として epitope の異なる数種の抗 vWF MoAb (NMC-4, 2-2-9, 及び 40-1) を用いて ELISA を行い、被検血漿とくに vWD 患者血漿中の vWF: Ag 量が各抗体に対する epitope の相違を反映しているか否かを

を検討した。対照として poly Ab をベルオキシターゼラベル二次抗体として用いた ELISA による vWF: Ag 量測定を行った。

a. ELISA 系の二次抗体の差異による正常血漿中 vWF: Ag 量の検討: 健康成人 30 名 (男 15 名, 女 15 名) について poly Ab を標識二次抗体として用いた ELISA (Poly-ELISA) にて測定した vWF: Ag は  $100.1 \pm 24.7 \text{ u/dl}$  (男  $107.6 \pm 21.6 \text{ u/dl}$ , 女  $92.6 \pm 25.3 \text{ u/dl}$ ) で、NMC-4, 2-2-9 及び 40-1 を標識二次抗体として用いた ELISA (NMC-4-ELISA, 2-2-9-ELISA, 40-1-ELISA) にて測定した vWF: Ag はそれぞれ  $108.4 \pm 31.8 \text{ u/dl}$  (男  $110.0 \pm 33.8 \text{ u/dl}$ , 女  $106.7 \pm 29.6 \text{ u/dl}$ ),  $118.9 \pm$

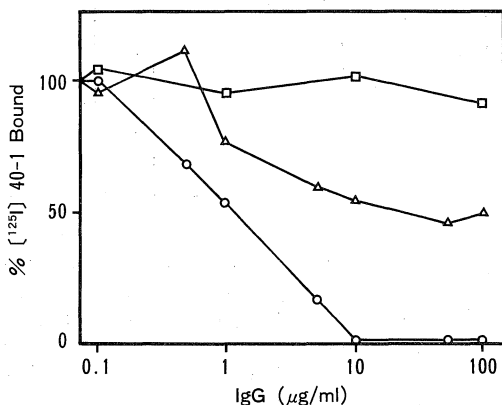


Fig. 3. Inhibition by anti-vWF MoAbs on the binding of  $[^{125}\text{I}]$  40-1 (IgG) to solid-phase vWF.

A total of  $500 \mu\text{l}$   $[^{125}\text{I}]$  40-1 (IgG  $0.5 \mu\text{g/ml}$ ) was added to each tube coated by vWF with or without IgGs from MoAbs 40-1 and 2-2-9. Anti-thyroglobulin MoAb (IgG) was used for control experiment. After incubation, these tubes were washed three times and radioactivity bound to the tubes was measured as described in "Materials and Methods". Open circles show MoAb 40-1, open triangles MoAb 2-2-9, and open squares anti-thyroglobulin MoAb.

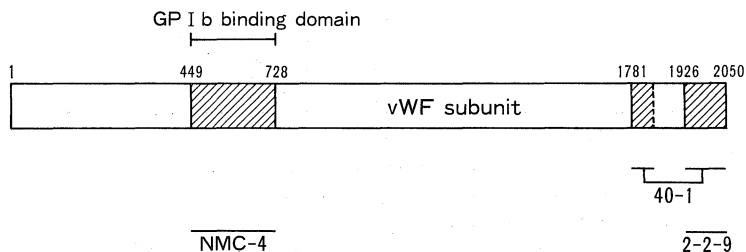


Fig. 2. Schematic representation of the identified epitopes of three anti-vWF MoAbs, NMC-4, 40-1 and 2-2-9, on vWF subunit.

31.3 u/dl(男 124.1 $\pm$ 29.9 u/dl, 女 113.7 $\pm$ 31.8 u/dl), 103.1 $\pm$ 25.5 u/dl(男 110.1 $\pm$ 21.6 u/dl, 女 96.1 $\pm$ 27.2 u/dl)であった。Poly-ELISA と NMC-4-ELISA, 2-2-9-ELISA, 40-1-ELISA による vWF: Ag との相関係数及び回帰直線はそれぞれ  $r=0.7618$ ,  $y=1.06x-2.03$ , ( $p<0.01$ ),  $r=0.7874$ ,  $y=1.17x+1.56$ , ( $p<0.01$ ),  $r=0.9850$ ,  $y=1.03x+0.85$ , ( $p<0.01$ )であった(Fig. 4)。従って健常成人ではいずれの ELISA 系においても vWF: Ag に差異は認められなかった。

b. NMC-4-ELISA と 2-2-9-ELISA で測定した正常人および vWD 患者血漿中の vWF: Ag 量: 健常成人 30 例における NMC-4-ELISA にて測定した vWF: Ag と 2-2-9-ELISA にて測定した vWF: Ag は前述のごとくであったが, 両者の相関係数及び回帰直線はそれぞれ  $r=0.8981$ ,  $y=1.10x+0.12$ , ( $p<0.001$ )であった(Fig. 5, left)。

vWD 患者血漿中の NMC-4-ELISA による vWF: Ag は Type I vWD 7 例では  $22.0\pm16.0$  u/dl, Type IIA

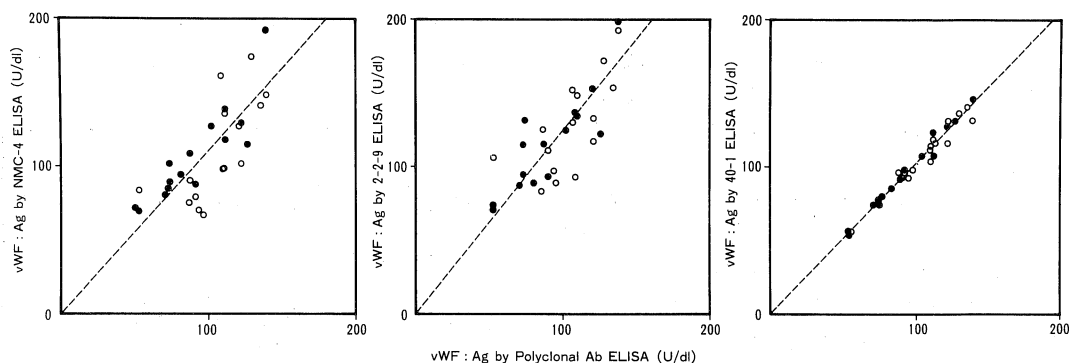


Fig. 4. Sandwich ELISA for the measurement of vWF: Ag using three anti-vWF MoAbs, NMC-4, 2-2-9 or 40-1 (from left to right) in 30 normal individuals.

Plasma vWF: Ag levels in 30 normal individuals were determined by sandwich ELISA, in which Poly Ab was used for captured antibody and three MoAbs (NMC-4, 2-2-9, 40-1) for the second antibody as described in "Materials and Methods". Each X-axis shows the results obtained from sandwich ELISA using double Poly Ab. Closed circles show normal female, and open circles normal male.

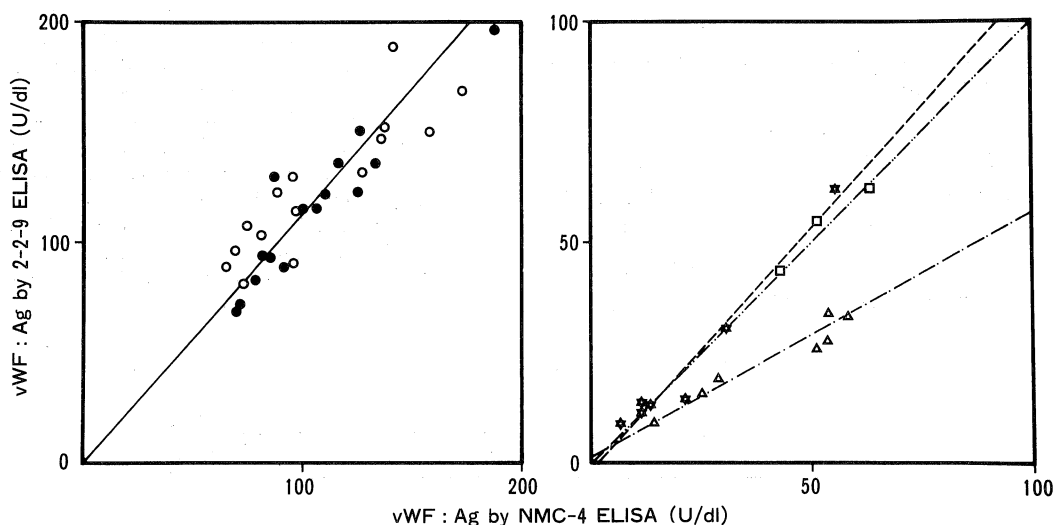


Fig. 5. Relationships between the plasma levels of vWF: Ag in normal individuals (left) and vWD patients (right), measured by 2-2-9 ELISA (Y-axis) and NMC-4 ELISA (X-axis).

Closed circles (normal female), open circles (normal male), open asterisks (type I vWD), open triangles (type IIA vWD), open squares (type IIB vWD). Regression lines are indicated as follows; normal plasma (—), type I vWD (-----), type IIA vWD (-----), type IIB vWD (-----).

7例では $40.9 \pm 16.4$  u/dl, Type IIB 3例では $53.3 \pm 8.6$  u/dlであった。2-2-9-ELISAによるvWF:AgはType I vWD 7例では $21.9 \pm 17.2$  u/dl, Type IIA 7例では $24.0 \pm 8.4$  u/dl, Type IIB 3例では $51.0 \pm 8.0$  u/dlであった。NMC-4-ELISAによるvWF:Agと2-2-9-ELISAによるvWF:Agとの相関係数及び回帰直線はType Iでは $r=0.9830$ ,  $y=1.05x-1.32$ , ( $p<0.001$ )と両ELISA系によるvWF:Agは有意な相関を示し、ほぼ等しい抗原性を呈していた。Type IIAでは相関は $r=0.9594$ と良好であったが、回帰直線は $y=0.54x+2.15$ , ( $p<0.001$ )で、2-2-9-ELISAによるvWF:Agの明らかな低下が認められた。Type IIBでは同一家系例ではあるが $r=0.9715$ ,  $y=0.97x-0.48$ , ( $p<0.2$ )で両ELISA系でのvWF:Agは有意な相関を示し、ほぼ等しい抗原性を呈していた(Fig. 5, right)。

各病型患者についてNMC-4及び2-2-9で測定したvWF:Agの比(2-2-9-ELISA/NMC-4-ELISA)を求めると、Type Iは $1.01 \pm 0.20$ , Type IIAは $0.61 \pm 0.08$ , Type IIBは $0.99 \pm 0.03$ であった。従って、Type IIAでは有意水準1%で統計学的に有意な低値を示し、Type IIAにおけるvWF subunitのC末端側とMoAb 2-2-9との免疫反応性が低下しているものと考えられた。

C. NMC-4-ELISAと40-1-ELISAで測定した正常人およびvWD患者血漿中のvWF:Ag量：前述のど

とくMoAb 2-2-9-ELISAによるType IIA患者血漿中のvWF:AgはNMC-4-ELISAによる値より低値を示したので、vWF subunit C末を認識するがMoAb 2-2-9とはやや異なる部位にepitopeが存在すると思われるMoAb 40-1を用いたELISAを行い、NMC-4-ELISAと比較した。

健康成人30例における40-1-ELISAにて測定したvWF:Agは $103.1 \pm 25.5$  u/dlであり、NMC-4-ELISAと40-1-ELISAにて測定したvWF:Agの相関係数及び回帰直線は $r=0.7726$ ,  $y=0.94x-1.23$ , ( $p<0.001$ )であった(Fig. 6, left)。

vWD患者血漿中の40-1 ELISAによるvWF:AgはType I vWD 7例では $24.3 \pm 19.2$  u/dl, Type IIA 7例では $40.1 \pm 16.8$  u/dl, Type IIB 3例では $53.0 \pm 8.3$  u/dlであった。NMC-4-ELISAによるvWF:Agと40-1-ELISAによるvWF:Agとの相関係数及び回帰直線は、Type Iでは $r=0.9830$ ,  $y=1.19x-1.79$ , ( $p<0.001$ ), Type IIAでは $r=0.9957$ ,  $y=1.02x-1.35$ , ( $p<0.001$ ), Type IIBでは $r=0.9896$ ,  $y=0.98x+0.93$ , ( $p<0.1$ )であり、Type I, IIA, IIBすべてで両ELISA系でのvWF:Agは有意な相関を示し、ほぼ等しい抗原性を呈していた(Fig. 6, right)。このようにType IIAにおいても40-1-ELISAで測定したvWF:AgはNMC-4-ELISAで得られた値とはdiscrepancyはなかった。このことよ

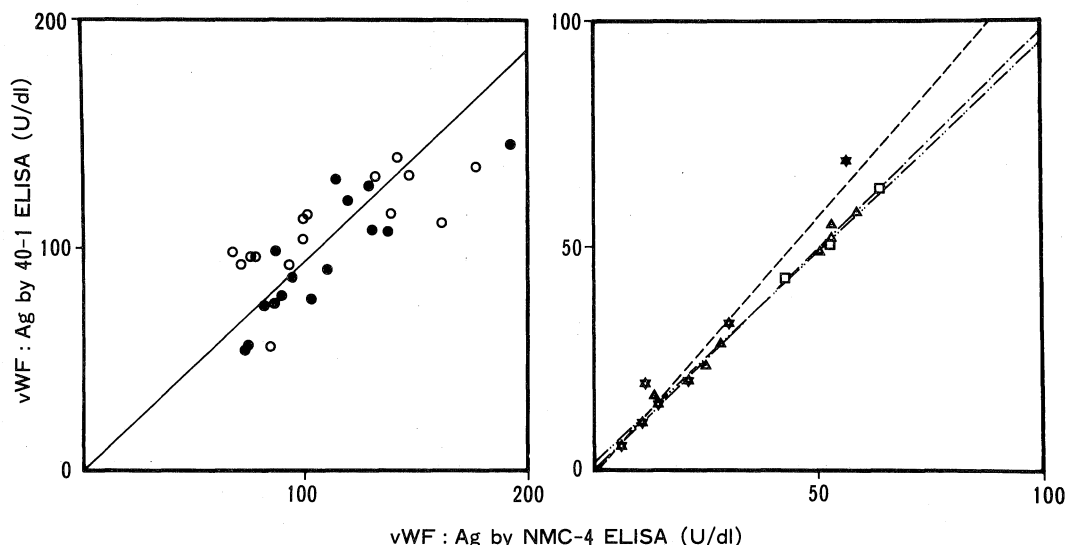


Fig. 6. Relationships between the plasma levels of vWF:Ag in normal individuals (left) and vWD patients (right), measured by 40-1 ELISA (Y-axis) and NMC-4 ELISA (X-axis).

Closed circles (normal female), open circles (normal male), open triangles (type IIA vWD), open squares (type IIB vWD), open asterisks (type I vWD). Regression lines are indicated as follows; normal plasma (—), type I vWD (---), type IIA vWD (.....), type IIB vWD (-.-.-).

り, Type IIA vWD の C 末端側における免疫反応性の低下は, MoAb 40-1 と 2-2-9 のエピトープの相連部にあることが示唆された。

4. 健康成人ならびに vWD 各病型患者血漿における NMC-4-ELISA による vWF:Ag と Rcof ならびに Bcof との関連性

健康成人において NMC-4-ELISA で測定した vWF:Ag は  $108.4 \pm 31.8$  u/dl, Rcof は  $112.7 \pm 31.9$  u/dl, Bcof は  $93.4 \pm 20.2$  u/dl であった。

NMC-4-ELISA で測定した vWF:Ag と Rcof 及び Bcof との相関係数はそれぞれ  $r=0.7011$ ,  $r=0.6917$  であ

った (Fig. 7)。

Type I vWD 患者血漿では, NMC-4-ELISA で測定した vWF:Ag は  $22.0 \pm 16.0$  u/dl, Rcof は  $11.0 \pm 6.4$  u/dl, Bcof は  $10.3 \pm 7.1$  u/dl であった。NMC-4-ELISA で測定した vWF:Ag と Rcof 及び Bcof との相関係数はそれぞれ  $r=0.7635$ ,  $r=0.5929$  であった (Fig. 8, top)。

Type IIA vWD 患者血漿では NMC-4-ELISA で測定した vWF:Ag は  $40.9 \pm 16.4$  u/dl, Rcof は全例 5 u/dl 以下で, Bcof は  $7.0 \pm 3.1$  u/dl であった。NMC-4-ELISA で測定した vWF:Ag と Rcof の間には全く相関性は認められず, Bcof は  $r=0.5831$  と弱いながらも相関性を示した (Fig. 8 middle)。

Type IIB vWD 患者血漿では NMC-4-ELISA で測定した vWF:Ag は  $53.0 \pm 8.6$  u/dl, Rcof は  $39.7 \pm 2.1$  u/dl, Bcof は  $21.3 \pm 4.5$  u/dl であった。NMC-4-ELISA による vWF:Ag と Rcof との相関係数は  $r=0.9899$ , Bcof との相関係数は  $r=0.9997$  であった (Fig. 8, bottom)。

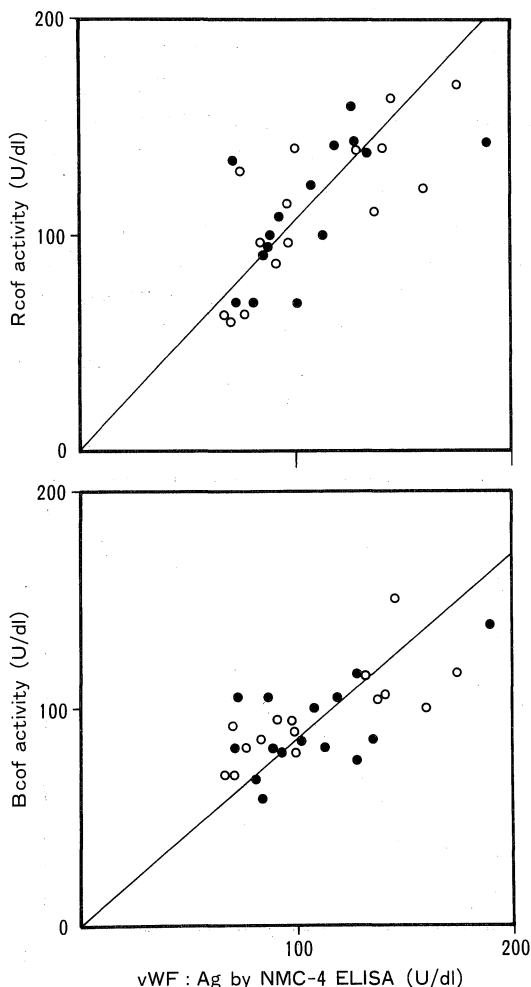


Fig. 7. Correlation of the plasma levels of vWF:Ag measured by NMC-4 ELISA vs Rcof activities (top) or Bcof activities (bottom) in normal individuals. Closed circles (normal female) and open circles (normal male).

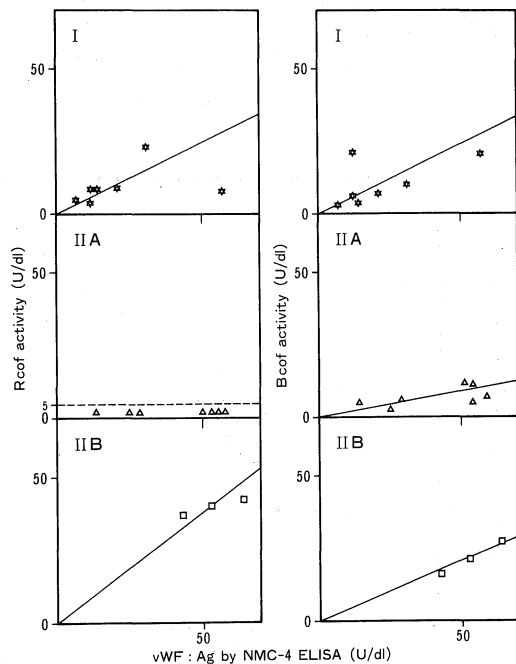


Fig. 8. Correlation of the plasma levels of vWF:Ag measured by NMC-4 ELISA vs Rcof activities (left) or Bcof activities (right) in vWD-patients.

(Top) open asterisks (type I vWD). (Middle) open triangles (type IIA vWD). (Bottom) open squares (type IIB vWD).



## 考 察

von Willebrand(1926)により見いだされた出血時間延長を特徴とする常染色体遺伝性疾患は今日、vWF遺伝子の欠陥によるvWF蛋白の量的ないし質的合成障害の観点より von Willebrand 病(vWD)として把握されている。現在 vWD は患者血漿中の vWF multimers のパターンから Type I, II, III に大別されている。Type I は vWF multimers の分布状態および機能は正常であるが、循環 vWF の量的低下を示すものである。Type II は血漿中で強い凝集能を示す large multimers の欠乏が特徴的な病型で諸種の subtype が存在している。このうち Type IIA は vWF: Ag 量に比し、Rcof 活性が低下している病型で、Type IIB は in vitro で患者血小板多血漿が低濃度の ristocetin でも凝集する特徴を有する病型である。Type III は常染色体劣性、F. VIII/vWF complex 活性の著しい低下、vWF-multimer bands の欠如を特徴とする病型である<sup>2)</sup>。

今回、著者は正常血漿及び vWD Type I, Type IIA ならびに Type IIB 患者血漿中の vWF: Ag 量について、固相化した抗 vWF 家兎血清(poly Ab)で血漿 vWF を捕捉し、二次抗体として GPIb 結合 domain を認識する MoAb NMC-4 あるいは vWF-subunit の C 末側を認識する MoAb 2-2-9 および 40-1 を用いた captured ELISA の系で比較検討した。

Scripps 研究所の Dr. Zimmerman より提供をうけた MoAb 2-2-9 は vWF 純化物を V-8 protease で消化して得た Fragment II(アミノ酸残基 1366-2050)上に epitope をもつことが観察されており<sup>11)</sup>、また、宝酒造片山政彦氏より提供された MoAb 40-1 も同様 Fragment II 上に epitope があることが観察されていた。著者はまず、両 MoAb の epitope の存在部位をより限定することを試みた。vWF-Fragment II の subtilisin 消化物をゲル濾過 HPLC および逆相 HPLC で分離した蛋白ピークについて 2-2-9 および 40-1 との免疫反応性を検討し、最終的に 2-2-9 の epitope は C 末端アミノ酸残基 1926-(2050)上の主に一次構造を認識し、一方 40-1 はアミノ酸残基から 1781 から始まる fragment とアミノ酸残基 1926 から始まる fragment が disulfide 結合にて形成された line 上のいずれかに存在する conformation epitope を認識していると考えられる所見を得た。

標識 NMC-4 を二次抗体とした NMC-4-ELISA による正常成人血漿 30 例の vWF: Ag は一次抗体および二次抗体とも poly Ab をもちいた poly-ELISA による vWF: Ag とよく相関( $r=0.7618, y=1.06x-2.03, (p<0.01)$ )

していた。また 2-2-9-ELISA 及び 40-1 ELISA による vWF: Ag もそれぞれ poly-ELISA の値とよく相関( $r=0.7874, y=1.17x+1.56 (p<0.01), r=0.9850, y=1.03x+0.85 (p<0.01)$ )していた。従って、健常成人ではいずれの ELISA 系においても vWF: Ag に差異は認められなかった。

vWD 各病型の患者血漿の各 ELISA 系による vWF: Ag は下記のごとくであった。

Type I 患者血漿 7 例における NMC-4-ELISA の vWF: Ag は  $22.0 \pm 16.0$  u/dl で正常血漿のそれよりは低下していたが、2-2-9-ELISA および 40-1-ELISA 測定値とよく相関していた。Type IIA 患者 7 例の患者血漿では NMC-4-ELISA の vWF: Ag は  $40.9 \pm 16.4$  u/dl であったが、2-2-9-ELISA 値は  $24.0 \pm 8.4$  u/dl で NMC-4-ELISA 値より低下していた。しかし、40-1-ELISA 値は NMC-4 ELISA 値とほぼ一致していた。Type IIB 患者 3 例の血漿では NMC-4-ELISA の vWF: Ag は  $53.3 \pm 8.6$  u/dl で、2-2-9-ELISA および 40-1-ELISA 測定値とほぼ一致していた。従って、Type I および Type IIB 患者血漿ではともにそれぞれの ELISA 系においても vWF: Ag に差異は認められなかったが、Type IIA 患者血漿では 2-2-9-ELISA 値は NMC-4-ELISA 値および 40-1-ELISA 値より低下していた。

MoAb NMC-4 の認識部位は vWF subunit の GPIb 結合 domain(アミノ酸残基 449-728)上に存在するが、この domain は ristocetin あるいは蛇毒 botrocetin で惹起される血小板膜上の GPIb との結合、凝集反応に関与する部位である。ristocetin 存在下で示されるこの機能 domain 活性即ち Rcof 活性は Type IIB vWD をのぞいては一般に低下することが認められている。Type I vWD 患者 7 例の血漿について Rcof は  $11.0 \pm 6.44$  u/dl で低下していたが、NMC-4-ELISA による vWF: Ag との相関係数は  $r=0.7635$  で比較的良好に相関していた。また Bcof は  $10.3 \pm 7.1$  u/dl で NMC-4-ELISA による vWF: Ag との相関  $r=0.5929$  で同様の傾向を示した。Type IIA 患者 7 例では Rcof は全例 5 u/dl 以下と著しく低下していたが、NMC-4-ELISA による vWF: Ag は  $40.9 \pm 16.4$  u/dl で全く相関性は認められなかった。Bcof は  $7.0 \pm 3.1$  u/dl で NMC-4-ELISA による vWF: Ag との相関は  $r=0.5831$  である程度相関性を示した。Type IIB 患者は 3 例であったが、Rcof は  $39.7 \pm 2.1$  u/dl、Bcof は  $21.3 \pm 4.5$  u/dl で、NMC-4-ELISA による vWF: Ag との相関は前者で  $r=0.9899$ 、後者で  $r=0.9997$  といずれもよく相関していた。従って、NMC-4

で測定された vWF: Ag 量は Rcof よりもむしろ Bcof とよく相関していた。

Type IIA の vWF multimer 構成は large および intermediate multimer を欠き, M. W.  $0.5 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$  Da の small multimer bands より成り立っている。ristocetin 存在下での血小板凝集は large multimer が最も強力であるため本病型での Rcof は著しく低下しているものと推察されている。一方, botrocetin は large ~ small にいたる multimer band と反応するため本病型でも Bcof 活性はある程度惹起されるものと思われる。

近年, vWF の各種機能 domain に対する特異性の高い抗 vWF MoAb が作製され, これらを用いて分子異常及び欠如の同定が試みられている。Sultan et al.<sup>15)</sup> は ristocetin 凝集能を抑制する 2 種の MoAb (4F91C5-IgG1, 202D3-IgG2a) を用いた免疫ラジオ測定法 (IRMA) による vWF: Ag は Type I 11 症例, Type IIA 6 例, Type IIB 4 例では抗 vWF 家兎血清 (poly Ab) による IRMA 値とよく相関したが, Type IIA 5 例では MoAb-IRMA 値は低値をしめすことを観察した。Chand et al.<sup>16)</sup> は, GPIb 結合 domain を認識する 2 種の MoAb (RFF-VIII: R/2, RFF-VIII: R/1) を用いた IRMA および ELISA 法で測定した 14 例の Type IIA における vWF: Ag は poly Ab を用いた Laurell 法より低値を示し, よりよく Rcof と相関したことより, この抗体で functional epitope を定量できる可能性をしめし, Type IIA subunit の分子構造異常が GPIb 結合 domain 上に存在する可能性を示した。しかし Type IIA 症例における彼等の成績は著者の成績とは異なっている。この差異については, 1. Type IIA も単一ではなく heterogeneous な group よりなっている。2. いずれも GPIb 結合 domain を認識する MoAb であっても, それぞれの epitope は一次配列あるいは三次構造的には少しづつ異なっていることに依る。3. 著者の観察した Type IIA においては GPIb 結合 domain 上の大きな抗原性の相違は認められず, この部位には大きな構造異常は存在せず, ristocetin, botrocetin 等のモジュレーターと GPIb 結合 domain との結合は直接損なわれず, 結合後の高次構造変化を通して影響を与えているなどの可能性が想像される。これらの成績のほかに, 今回著者は Type IIA vWD では C 末端側を認識する MoAb 40-1 をもちいた場合の vWF: Ag は NMC-4 を用いた場合と同様であったが MoAb 2-2-9 を用いた場合は免疫反応性が低下することを観察した。このことは Type IIA では MoAb 2-2-9 と MoAb 40-1 の認識部位の差, 即ち共に vWF subunit の C 末端上に epitope が存在するも 2-2-9 は 40-1 より

もより C 末端側に認識部位を有し, Type IIA では一次的あるいは二次的にこの部に構造異常が存在するのではないかと推察される。

一方, Type IIB vWD においては, 大きな免疫反応性の低下は観察されなかった。

## 結 語

抗 vWF 家兎血清 (Poly Ab) を一次抗体とし, 二次抗体として vWF-subunit 上の GPIb 結合 domain を認識する MoAb NMC-4 および vWF-subunit C 末端を認識する二種の MoAb; 2-2-9 と 40-1 を用いた ELISA 系で正常および vWD 各種病型患者血漿中の vWF: Ag を比較検討した。

1. MoAb 2-2-9 の epitope は vWF subunit のアミノ酸残基 1926-(2050) 上に存在した。一方, MoAb 40-1 の epitope は disulfide 結合したアミノ酸残基 1781 から始まる fragment とアミノ酸残基 1926-(2050) からなる fragment の結合物上に存在するものと考えられる成績であった。

2. 標識 NMC-4 を二次抗体とした NMC-4-ELISA による正常人血漿 30 例の vWF: Ag は,  $108.4 \pm 31.8$  u/dl で一次抗体および二次抗体とも Poly Ab を用いた ELISA 値と  $r=0.7618$  でよく相関した。2-2-9-ELISA による vWF: Ag は  $118.4 \pm 31.8$  u/dl, 40-1-ELISA による vWF: Ag は  $103.1 \pm 25.5$  u/dl で, それぞれ Poly-ELISA と  $r=0.7874$ ,  $r=0.9850$  とよく相関していた。

3. Type I vWD 患者 7 例の血漿中の NMC-4-ELISA による vWF: Ag は  $22.0 \pm 16.0$  u/dl, 2-2-9-ELISA 値  $21.9 \pm 17.2$  u/dl, 40-1-ELISA 値  $24.3 \pm 19.2$  u/dl で 3 者はよく相関していた。Type IIA vWD 患者 7 例の血漿中の NMC-4-ELISA による vWF: Ag は  $40.9 \pm 16.4$  u/dl, 2-2-9-ELISA 値  $24.0 \pm 8.4$  u/dl, 40-1-ELISA 値  $40.1 \pm 16.8$  u/dl で 3 者はよく相関していたが, MoAb 2-2-9 において明らかな免疫反応性の低下が認められた。Type IIB vWD 患者 3 例の血漿中の NMC-4-ELISA による vWF: Ag は  $53.3 \pm 8.6$  u/dl, 2-2-9-ELISA 値  $51.0 \pm 8.0$  u/dl, 40-1-ELISA 値  $53.0 \pm 8.3$  u/dl で 3 者はよく相関し, いずれにおいても免疫反応性に差異は認められなかった。

4. 正常人血漿中の NMC-4-ELISA による vWF: Ag は Ristocetin cofactor (Rcof) 活性と  $r=0.7011$ , Botrocetin cofactor (Bcof) 活性と  $r=0.6917$  で相関していた。

5. Type I vWD 患者血漿では, NMC-4-ELISA で測定した vWF: Ag は Rcof と  $r=0.7635$ , Bcof と  $r=$

0.5929 で相関していた。Type IIA vWD 患者血漿では NMC-4 ELISA で測定した vWF: Ag と Rcof の間には全く相関性は認められず、Bcof は、 $r=0.5831$  と弱いながらも相関性を示した。Type IIB vWD 患者血漿では、NMC-4-ELISA による vWF: Ag は Rcof と  $r=0.9899$ , Bcof と  $r=0.9997$  でよく相関していた。従って、NMC-4 で測定された vWF: Ag は Rcof よりむしろ Bcof をより強く反映していると考えられた。

稿を終えるにあたり、アミノ酸配列の解析にご援助いただいた藤田学園保健衛生大学医高分子 千谷晃一教授に深謝いたします。

尚、本研究は平成3年度文部省科学研究費「von Willebrand 病の各病型における分子遺伝学的解析」(課題番号 02454273) の助成を受けた。

本論文の要旨は、第53回日本血液学会総会 (1991, Kyoto) に於て発表した。

## 文 献

- 1) 藤村吉博: von Willebrand 因子の構造と機能. 血液と脈管 20: 1-12, 1989.
- 2) Ruggeri, Z. M. and Zimmerman, T. S.: von Willebrand factor and von Willebrand disease. Blood 70: 895-904, 1987.
- 3) Chopek, M. W., Girma, J. P., Titani, K. and Davie, E. W.: Human von Willebrand factor: a multivalent protein composed of identical subunits. Biochemistry 25: 3146-3155, 1986.
- 4) Titani, K., Kumer, S., Takio, K., Ericsson, L. H., Wade, R. D., Ashida, K., Walsh, K. A., Chopek, M. W., Sadler, J. E. and Fujikawa, K.: Amino acid sequence of human von Willebrand factor. Biochemistry 25: 3171-3184, 1986.
- 5) Foster, P. A., Fulcher, C. A., Marti, T., Titani, K. and Zimmerman, T. S.: A major factor VIII binding domain resides within the aminoterminal 272 amino acid residues of von Willebrand factor. J. Biol. Chem. 262: 8443-8446, 1987.
- 6) Takahashi, Y., Kalafatis, M., Girma, J. P., Sewerin, K., Andersson, L. O. and Meyer, D.: Localization of factor VIII binding domain on a 34 kilodalton fragment of the N-terminal protein portion of von Willebrand factor. Blood 70: 1679-1682, 1987.
- 7) Fujimura, Y., Titani, K., Holland, L. Z., Russell, S. C., Robert, J. R., Elder, J. H., Ruggeri, Z. M. and Zimmerman, T. S.: von Willebrand factor; a reduced and alkylated 52/48kDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein Ib. J. Biol. Chem. 261: 381-385, 1986.
- 8) Fujimura, Y., Titani, K., Holland, L. Z., Robert, J. R., Kostel, P., Ruggeri, Z. M. and Zimmerman, T. S.: A heparin-binding domain of human von Willebrand factor. Characterization and localization to a tryptic fragment extending from amino acid residue Val-449 to Lys-728. J. Biol. Chem. 262: 1734-1739, 1987.
- 9) Fujimura, Y., Holland, L. Z., Ruggeri, Z. M. and Zimmerman, T. S.: The von Willebrand factor domain mediating botrocetin-induced binding to glycoprotein Ib lies between Val449-Lys728. Blood 70: 985-988, 1987.
- 10) Mohri, H., Fujimura, Y., Shima, M., Yoshioka, A., Houghten, R. A., Ruggeri, Z. M. and Zimmerman, T. S.: Structure of the von Willebrand factor domain interacting with glycoprotein Ib. J. Biol. Chem. 263: 17901-17904, 1988.
- 11) Fujimura, Y., Usami, Y., Titani, K., Niinomi, K., Nishio, K., Takase, T., Yoshioka, A. and Fukui, H.: Studies on anti-von Willebrand factor (vWF) monoclonal antibody NMC-4, which inhibits both ristocetin and botrocetin-induced vWF binding to platelet glycoprotein Ib. Blood 77: 113-120, 1991.
- 12) Kalafatis, M., Takahashi, Y., Girma, J. P. and Meyer, D.: Localization of a collagen interactive domain of human von Willebrand factor between amino acid residues Gly-911 and Glu-1365, Blood 70: 1577-1583, 1987.
- 13) Pareti, F. I., Niiya, K., Kostel, P. J., McPherson, J. M. and Ruggeri, Z. M.: Isolation and characterization of two domains of human von Willebrand factor that interact with fibrillar collagen type I and III. J. Biol. Chem. 262: 13835-13841, 1987.
- 14) Plow, E. F., Pierschbacher, M. D., Ruoslahti, E., Marguerie, G. A. and Ginsberg, M. H.: The effect of Arg-Gly-Asy-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to

- platelet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 8057-8061, 1985.
- 15) **Zimmerman, T. S., Ratnoff, O. D. and Powell, A. E.** : Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor VIII deficiency) and von Willebrand's disease. *J. Clin. Invest.* **50**: 224, 1971.
  - 16) **Hoyer, L. W.** : Immunologic studies of anti-hemophilic factor(AHF, factor VIII). IV: Radioimmunoassay for AHF antigen. *J. Lab. Clin. Med.* **80**: 822-833, 1972.
  - 17) **Goodall, A. H., Jarvis, J., Chand, S., Rawlings, E., O'Brien, D. P., McGraw, A., Hutton, R. and Tuddenham, E. G. D.** : An immunoradiometric assay for human Factor VIII/von Willebrand Factor (VIII/vWF) using monoclonal antibodies that defined a functional epitope. *Brit. J. Haematol.* **59**: 565-577, 1985.
  - 18) **Sultan, Y., Avner, P. H., Maissonneuve, P., Arnaud, D. and Jeanneau, C. H.** : An immunoradiometric assay for Factor VIII related antigen (VIIIIRAg) using two monoclonal antibodies-comparison with polyclonal rabbit antibodies for use in von Willebrand's disease diagnosis. *Thromb. Haemost.* **52**: 250-252, 1984.
  - 19) **Chand, S., McCraw, A., Hutton, R., Tuddenham, E. G. D. and Goodall, A. H.** : Two site monoclonal antibody based immunoassay for von Willebrand factor-Demonstration that vWF function resides in a conformational epitope. *Thromb. Haemost.* **55**: 318-324, 1986.
  - 20) 嶋 緑倫, 森本純司, 今井俊介, 蝶良義彦, 吉岡章, 福井 弘 : von Willebrand 因子 (vWF) に対するモノクローナル抗体の作製とその免疫学的特性. *奈医誌.* **36**: 662-669, 1985.
  - 21) **Girma, J. P., Chopek, M. W., Titani, K. and Davie, E. W.** : Limited proteolysis of human von Willebrand factor by staphylococcus aureus V-8 protease: Isolation and partial characterization of a platelet-binding domain. *Biochemistry* **25**: 3156-3163, 1986.
  - 22) **Fujimura, Y., Titani, K., Usami, Y., Suzuki, M., Oyama, R., Matsui, T., Fukui, H., Sugimoto, M. and Ruggeri, Z. M.** : Isolation and chemical characterization of two structurally and functionally distinct forms of botrocetin, the platelet coagglutinin isolated from the venom of Bothrops jararaca. *Biochemistry* **30**: 1957-1964, 1991.
  - 23) 西尾健治 : 蛇毒 botrocetin で発現される von Willebrand 因子活性に関する研究 I. Botrocetin cofactor 活性測定の検討. *奈医誌.* **39**: 673-682, 1988.
  - 24) **Ey, P. L., Prowse, S. J. and Jenkin, C. R.** : Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. *Immunochemistry* **15**: 429-436, 1978.
  - 25) **Fraker, D. J. and Speck, J. C.** : Protein and cell membrane iodination with sparingly soluble chloroamide, 1, 3, 4, 6, -tetrachloro-3a, 6a-diphenylglycoluril. *Biophys. Res. Commun.* **80**: 849-857, 1987.
  - 26) **Nakane, P. K. and Pierce, G. B.** : Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J. Cell. Biol.* **33**: 307-, 1967.
  - 27) **Yoshioka, A., Giddings, J. C., Thomas, J. E., Fujimura, Y. and Bloom, A. L.** : Immunoassays of factor IX antigen using monoclonal antibodies. *Br. J. Haematol.* **59**: 265-275, 1985.